

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

骨髓異形成症候群に対する画期的治療法に関する研究

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 三谷 絹子

平成 18 (2006) 年 3 月

# 目 次

## I. 総括研究報告

骨髓異形成症候群に対する画期的治療法に関する研究 獨協医科大学・内科学（血液） 三谷 絹子 .....	1
--	---

## II. 分担研究報告

1. 骨髓異形成症候群の白血化における TEL-p53 経路の関与 獨協医科大学・内科学（血液） 三谷 絹子 .....	9
2. 骨髓異形成症候群における免疫抑制剤の作用機序に関する研究 京都大学医学部附属病院血液・腫瘍内科 内山 卓 .....	11
3. 骨髓異形成症候群に対する画期的治療法に関する研究 名古屋大学大学院医学系研究科血液腫瘍内科学 直江 知樹 .....	13
4. テロメア制御異常の解析 東京医科大学内科学第一講座 大屋敷 一馬 .....	15
5. 骨髓異形成症候群に対する画期的治療法に関する研究 広島大学原爆放射線医科学研究所 稲葉 俊哉 .....	17
6. プロテオミクスの手法を用いた MDS 関連蛋白の同定とその解析 東京女子医科大学血液内科 寺村 正尚 .....	19
7. CGH アレイを用いた MDS の原因遺伝子の探索 東京大学医学部附属病院造血再生医療講座 小川 誠司 .....	21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	27
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	31
-----------------------	----

# I. 総括研究報告

## 骨髄異形成症候群に対する画期的治療法に関する研究

主任研究者 三谷 絹子 獨協医科大学 内科学（血液） 教授

### 研究要旨

骨髄異形成症候群(以下 MDS)は、汎血球減少と急性骨髄性白血病(AML)への進展を特徴とする予後不良の難治性造血障害である。本研究は MDS の病態解明とこれに基づく画期的治療法の開発を目的とする。分子病態解明を推進するため、(1) ゲノム・蛋白レベルでの MDS 原因遺伝子の網羅的探索、(2) 特異的遺伝子(ヌクレオフォスミン NPM1・転写因子遺伝子・テロメ制御遺伝子等)の変異の解析を実施した。(3) MDS 新規治療法の開発では、すでに実施された臨床研究「低リスク骨髄異形成症候群に対するシクロスポリン療法」の効果予測因子として T 細胞のクロナリティーを解析し、新規治療候補薬亜ヒ酸の正常造血への影響を検討した。(1)においては、Affymetrix 社の SNP タイピング用オリゴヌクレオチドアレイを用いた高精度ゲノム解析システム(CNAG)を構築し、MDS で高頻度にゲノムコピー数の異常およびヘテロ接合性の消失(LOH)が観察される領域を同定した。また、長鎖 PCR 支援マイクロアレイ CGH 法により、7 番染色体長腕領域(7q)に存在する有力な候補遺伝子 *Miki*、*Kasumi*、*Titan* を単離し、これらの機能解析を行った。一方、末梢血好中球を用いたプロテオーム解析により、MDS 特異的に高発現している蛋白 CapG および Thiol-specific antioxidant protein (TSA)等を同定した。(2)においては、AML の 1/4 に観察される *NPM1* 遺伝子の変異が MDS でも約 10%に観察されることが明らかになった。MDS が AML に移行する際に失活するがん抑制遺伝子 *TEL* は、骨髄球のアポトーシス制御に関与していることも示された。MDS 症例においてはテロメラーゼの鋳型 RNA 部分である hTERC の変異は観察されなかった。(3)においては、微小 T 細胞クローンの頻度の低い例でシクロスポリンの反応性が高いことが示唆された。また、亜ヒ酸投与を受けた急性前骨髄球性白血病症例を検討することにより、亜ヒ酸は好中球を減少させ、血清中のエリスロポエチン濃度を増加させることを明らかにした。以上の研究により、今後ゲノム研究を展開するために有力なツールとなる新たなゲノム解析システム CNAG を開発することができた。また、7q の候補遺伝子および MDS に特異的な発現異常蛋白が同定され、これらの機能解析が進行中である。MDS の病態解明に大きく貢献するとともに、新たな治療法の確立に役立つものと思われる。治療開発研究としては、国際的にも新規の「低リスク骨髄異形成症候群に対するシクロスポリン療法」の作用機序および効果判定に関する新しい知見が得られた。亜ヒ酸は MDS の治療薬として有望であることが明らかになり、今後臨床試験が進むことが期待される。最後に、本年度は班研究の基盤整備を目的として、MDS 検体バンク設立（東日本：獨協医科大学、西日本：京都大学担当の予定）のための準備および班活動公開のためのホーム・ページ開設を行った。

### 分担研究者

- |                                  |                                  |
|----------------------------------|----------------------------------|
| ・内山 卓<br>京都大学医学部<br>血液・腫瘍内科学 教授  | ・稲葉俊哉<br>広島大学<br>原爆放射線医科学研究所 教授  |
| ・直江 知樹<br>名古屋大学医学部<br>分子細胞内科学 教授 | ・寺村正尚<br>東京女子医科大学<br>血液内科学 講師    |
| ・大屋敷一馬<br>東京医科大学<br>内科学1 教授      | ・小川誠司<br>東京大学医学部<br>造血再生医療講座 助教授 |

## A. 研究目的

骨髓異形成症候群（以下 MDS）は多系統におよぶ造血障害と白血病への移行を特徴とするヘテロな難治性疾患群である。本症の予後は一般に不良であり、多くの症例は種々の治療に抵抗して急性骨髄性白血病（以下 AML）への進展ないしは汎血球減少による重篤な感染症や出血により不帰の転帰をとる。MDS はとくに高齢者を中心として近年増加の一途を辿っており、その病態の解明と有効な治療法の確立が急務となっている。MDS の分子病態は非常に多様であり、多段階的にがん遺伝子・がん抑制遺伝子の変異が蓄積することにより、発症・進展する。これらの遺伝子異常は、造血幹細胞の分化・増殖・アポトーシスの異常、あるいは、免疫学的異常の分子基盤になるものと考えられる。しかしながら、既知の分子機構のみで MDS の複雑な病態を説明することは不可能であり、今後も網羅的検討を継続する必要がある。

治療面では、造血幹細胞移植療法が現在本症に対して治癒を期待できる唯一の治療手段であるが、移植は治療関連死亡が多く、また MDS が高齢者に好発することを考えると、今後迎える高齢化社会においては副作用や合併症の少ない生理的な治療法の開発が必要となる。しかしながら、メチル化阻害剤・免疫調節薬（サリドマイド誘導体）の臨床導入において本邦は欧米諸国に大きく遅れをとっている。

このような現状に鑑み、本研究はゲノム・蛋白の網羅的解析および特異的遺伝子の変異解析により、MDS の病因や病態に深くかかわる分子を同定し、これらの分子を標的とする MDS の新規診断技術・治療法の開発を行うことを目的としている。さらに、新規治療開発に直結する国内で現在可能な臨床試験を推進することは重要な課題である。

## B. 研究方法

(1) ゲノム・蛋白レベルでの MDS 原因遺伝子の網羅的探索

A. ゲノムレベルでの探索（小川、稲葉）

Affymetrix GeneChip 100K/500K は大規模 SNP タイピング用に開発された高密度オリゴヌクレオチドアレイで、数百万個の SNP 特異的プローブセットを用いて、それぞれ 10 万ないし 50 万 SNPs のタイピングが可能である。アレイシグナルに含まれる系統的誤差を統計的に処理することにより、GeneChip を用いて高精度のゲノムコピー数の解析を可能とするゲノムの統合解析環境(CNAG)の開発を行った。これを用いて、種々の病型を含む 150 例の MDS 検体からゲノム DNA を抽出し、ゲノムコピー数の定量を行った。また、同時に得られる大量の SNP 情報に基づいてゲノムワイドな LOH の解析を行った。（小川）。一方、長鎖 PCR 支援マイクロアレイ CGH 法によって同定された 7q- の候補遺伝子 *Miki*, *Kasumi*, *Titan* の機能解析を行った。大腸菌に発現させた遺伝子産物をウサギに免疫してポリクローナル抗体を得た。結合蛋白は、アフィニティ精製後 SDS-PAGE で分離、銀染色後目的バンドを切り出し、TOF/TOF 型の質量解析器で同定した。（稲葉）

B. 蛋白レベルでの探索（寺村）

不応性貧血（RA）患者および正常人の末梢血好中球よ

り蛋白を抽出した後、二次元電気泳動を行い両者の泳動パターンについて解析ソフト(Ettan progenesis)を用いて比較検討した。発現量に差が認められたスポットについて質量分析 (MALDITOF/TOFMS) を行い、ペプチドデータベース (MASCOT) を用いて蛋白を同定した。同定した蛋白の好中球における遺伝子発現についてリアルタイム PCR 法を用いて検討するとともに、免疫染色により細胞内局在を決定した。

(2) 特異的遺伝子の変異の解析（直江、三谷、大屋敷）  
AML で高頻度に観察される *NPM1* 遺伝子の変異を、AML および MDS 症例を用いて検討した。（直江）  
MDS 症例におけるがん抑制遺伝子 *TEL* のアイソフォームの発現パターンを RT-PCR 法によって検討した。

さらに、骨髓球における *TEL* 遺伝子の機能を 32D 細胞に強制発現することにより解析した。（三谷）  
MDS 症例を用いてテロメラーゼの鋳型 RNA 部分である hTERC の突然変異の有無を PCR 法および direct sequencing 法により解析した。また、テロメラーゼおよびテロメラーゼ活性を測定した。（大屋敷）

(3) MDS の新規治療法の開発

A. シクロスポリン療法の効果予測因子の検討（内山）

本研究班で行われた「低リスク骨髓異形成症候群に対するシクロスポリン療法」の臨床試験に参加した患者より採取した末梢血単核球より RNA を抽出し、T 細胞受容体のレパトア解析および spectratyping 法によるクロナリティーの解析を行った。

B. 亜ヒ酸の血液学的効果の検討（直江）

名大病院で亜ヒ酸による地固め療法（亜ヒ酸 0.15 mg/kg 毎日 28 日間）を受けた急性前骨髄球性白血病寛解期 7 例、のべ 17 コースにおける末梢血液所見・血清中エリスロポエチン (Epo) 値を経時的に観察した。さらに、血清中 Epo 値上昇の分子基盤について Hep3B 細胞を用いて検討した。

(4) MDS 検体バンク設立の準備（三谷・内山）

臨床情報とリンクしたかたちで全国規模の MDS 分子病態研究を推進する目的で、検体バンク設立の準備を行った。

(5) ホーム・ページの開設（三谷）

班活動を広く研究者に公開し、また、患者の疾患および治療法に対する理解を支援する目的で、ホーム・ページを開設した。

（倫理面への配慮）

本研究で実施される患者検体を用いた遺伝子解析研究は、原則として腫瘍細胞の体細胞突然変異を扱うものであるが、平成 16 年度文部科学省、厚生労働省および経済産業省告示第 1 号「ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針」を遵守し、事前に各参加施設の倫理委員会の承認を得た。また、臨床研究は平成 16 年厚生労働省告示 459 号「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、事前に各参加施設の倫理委員会の承認を得た。いずれも研究対象者より文書による同意を得ている。

## C. 研究結果

(1) ゲノム・蛋白レベルでの MDS 原因遺伝子の網羅的探索

A. ゲノムレベルでの探索

独自に開発した CNAG を用いて MDS150 症例のゲノムコピー数を解析した結果、5q-, 7q-, +8, 12p-, 13q-,

17p-, 20q-など従来の染色体分析により報告されている代表的な染色体異常が描出されたが、これらの異常の切断点を極めて高精度(〜100Kb 程度)に同定することが可能であった。例えば、20q の共通欠失領域は約 5 個の既知の構造遺伝子が存在する 400Kb 程度の領域にマッピングされた。一方、従来の染色体検査では同定し得なかった微細な領域におけるコピー数の異常が多数同定され、多くの領域について単一の責任遺伝子の候補を同定することが可能であった(既知の例では、21q の AML1, 12p の K-RAS, 17q の NF-1 など)。一方、SNP タイピングデータを用いた解析により、多数の LOH を示す領域が同定された。さらに、約 20% の症例では、アレルの特定の領域が胚細胞レベルで長距離にわたってホモ接合を生じており、MDS の発症に遺伝的背景が関与している可能性が示唆された。(小川)

7q-の候補遺伝子 *Miki*, *Kasumi*, *Titan* は、進化上脊椎動物になって出現した遺伝子である。いずれも既知遺伝子との相同性に乏しく、既知モチーフを保有しない。*Titan* と *Kasumi* は N 末側の無構造領域(ループ)で、二本鎖 DNA 切断後の修復の際に非相同組換え断端結合(NHEJ)を担う Ku70/Ku80/DNA-PKcs 複合体と結合することが明らかになった。いずれも主に細胞質内に局在するが、放射線照射やマイトマイシン C 処理により核内に移行するため、DNA 損傷修復に関与していると考えられた。一方、*Miki* は分裂間期には細胞質にびまん性に存在するが、分裂期には、まず中心体に共局在し、続いてそれより伸びる紡錘糸に局在することが明らかになった。(稲葉)

#### B. 蛋白レベルでの探索

MDS 好中球で発現が亢進している蛋白として CapG および Thiol-specific antioxidant protein (TSA)を同定した。MDS 好中球では CapG のリン酸化レベルが低下しており、細胞内局在は細胞質から核内へシフトする傾向を認めた。TSA の発現は mRNA レベルでは変化していなかった。(寺村)

#### (2) 特異的遺伝子の変異の解析

成人 AML の 1/4 の症例および MDS の約 1 割 (42 例中 4 例) の症例において、*NPM1* 遺伝子の C 末端のフレーム・シフト変異 (いずれも 4bp の挿入) が観察された。MDS の変異陽性の 2 例は白血病への移行例、2 例は正常核型の RAEB-t であった。CMMoL や RAEB、RA には変異を認めなかった。RA の 11 例中 3 例においては *NPM1* の mRNA 発現が低下していた。(直江) MDS から白血化した症例においては *TEL* のドミナント・ネガティブアイソフォームが高頻度に発現していた。また、32D 細胞において野生型 *TEL* は IL-3 存在下では増殖抑制に作用し、G-CSF 存在下ではアポトーシスを誘導した。*TEL* 発現 32D 細胞では p53 蛋白の発現レベルが上昇していた。(三谷)

42 症例の MDS 検体でのテロメア短縮例は 27%、テロメア正常例は 69%、テロメア延長例は 5%であり、テロメラーゼ活性は全例で正常造血細胞と同様に低下していた。MDS 症例で hTERC の突然変異は検出されず、514 番目の SNP の偏りも観察されなかった。(大屋敷)

#### (3) MDS の新規治療法の開発

##### A. シクロスポリン療法の効果予測因子の検討 (内山)

検討した 19 例の解析において全例で T 細胞の微少クローン性増殖が見られた。代表的な 12 種類の Vβ における微少クローンの頻度をもとに T 細胞のレパトアの多様性を 3 段階に分け、シクロスポリンの臨床効果と比較したところ、微少 T 細胞クローンの頻度の低い例でシクロスポリンの反応性が高いことが示唆された。

##### B. 亜ヒ酸の血液学的効果の検討 (直江)

亜ヒ酸投与後の急性前骨髄球性白血病症例では、白血球数は減少し、特に好中球数減少が著明であった。赤血球数の変動は軽度であったが、網状赤血球数は倍増した。血清中の Epo 値は増加していた。Hep3B 細胞の Epo mRNA は亜ヒ酸投与により用量依存性に増加し、転写因子 HIF1  $\alpha$  の誘導を伴っていた。

##### (4) MDS 検体バンク設立の準備 (三谷・内山)

研究計画書「骨髄異形成症候群に対する検体集積事業ならびに遺伝子解析研究」(研究代表者、獨協医科大学 三谷絹子; 検体集積事業総括責任者、京都大学 内山 卓) が作成された。東日本のバンクは獨協医科大学に、西日本のバンクは京都大学に設置する予定である。これらの検体の臨床情報は、厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「特発性造血障害に関する調査研究班」(班長 小澤敬也) および本班で実施される「再生不良性貧血と骨髄異形成症候群の前方視症例登録・セントラルレビュー・追跡調査研究」とリンクさせることにより得られる。また、個別研究 1 「造血器腫瘍における遺伝子異常の網羅的解析」(東京大学 小川誠司) および個別研究 2 「骨髄異形成症候群の分子病態の解析と層別化治療の確立」(獨協医科大学 三谷絹子) も提案されている。今後これらの研究計画書を関係各施設の倫理委員会に申請する予定である。

##### (5) ホーム・ページの開設 (三谷)

以下のホーム・ページを開設した。

<http://plaza.umin.ac.jp/~mhlw-mds/index.html>

#### D. 考察

(1) ゲノム・蛋白レベルでの MDS 原因遺伝子の網羅的探索

MDS には 5q-, 7q-あるいは 20q-等の染色体部分欠失が高頻度に観察される。これらの欠失部位には MDS 発症に関与するがん抑制遺伝子が存在すると考えられるが、今日までその責任遺伝子は同定されていない。しかしながら、Affymetrix GeneChip を基礎とした CNAG の開発により、SNP 特異的プローブの使用によるアレル別のコピー数の検出やゲノムワイドな LOH の解析が可能となった。GeneChip を用いた 150 例のゲノム解析では、従来の解析手段では同定不可能なコピー数異常を示す微小な領域が多数同定された。本システムでは、その高い解像度により、多くの領域について標的遺伝子の候補の同定が可能であった。さらに、LOH 解析により、MDS の成因に遺伝的背景が関与している可能性が示唆された。

昨年同定された 7q-の候補遺伝子 *Titan* および *Kasumi* は既知分子との相同性は保有しないが、その機能解析により、DNA 修復に関与している可能性が示唆された。MDS 症例ではミスマッチ修復遺伝子の変異は稀であるが、非相同組換え断端結合の異常が発症に関与している可能性があり興味深い。

プロテオーム解析では、MDS 好中球で特異的に高発現している Cap G および TSA が同定された。MDS 症例では好中球遊走能に関与している Cap G のリン酸化状態および細胞内局在が変化していた。TSA は活性酸素種 (ROS) 消去に重要な役割を担っている。これらの知見は MDS の分子病態を考察する上で極めて興味深く、新たな診断法開発に直結する可能性がある。

#### (2) 特異的遺伝子の変異の解析

AML で高頻度に観察される *NPM1* 遺伝子の変異が MDS でも観察された。*NPM1* 遺伝子のヘテロノックアウトマウスは MDS を発症することから、*NPM1* の機能異常は MDS の発症に重要な役割を担っている可能性がある。

病期の進展した MDS 症例では、がん抑制遺伝子 *TEL* がアイソフォームの発現パターンの変化により失活していることが示された。*TEL* の機能解析の結果、野生型 *TEL* は p53 の蛋白レベルを上げることにより骨髄球系細胞にアポトーシスを誘導することが明らかになった。*TEL* の失活は p53 の機能を負に制御することにより、MDS を進展させると考えられる。この知見は、MDS 白血化の代表的な機序である p53 遺伝子失活に新たな分子基盤を提供するものである。

hTERC の突然変異はテロメラーゼ活性に影響を及ぼすことが知られているが、今回の検討では MDS 症例に hTERC の突然変異は観察されなかった。多くの MDS 患者ではテロメアが短縮しているにもかかわらず、テロメラーゼの再活性化がみられないが、このことは hTERC 変異よりもテロメア結合蛋白の異常によるテロメア長監視機構の障害によるものと考えられた。

#### (3) MDS の新規治療法の開発

##### A. シクロスポリン療法の効果予測因子の検討 (内山)

MDS 患者においては T 細胞の微小クローン性増殖が認められ、これが MDS の免疫病態の成立に関与していると考えられた。患者末梢血より分離した CD4 陽性 T 細胞を抗 CD3 抗体と抗 CD134 抗体で刺激することにより、シクロスポリン療法の標的となる  $\gamma$ -interferon 産生性 memory CD4+T 細胞の増幅・同定を試みる予定である。

##### B. 亜ヒ酸の血液学的効果の検討 (直江)

欧米では亜ヒ酸投与により一部の MDS 症例に赤血球回復が認められたとの報告がある。今回の検討では、亜ヒ酸投与後の AML 症例の血清 Epo 値が上昇することが示され、これは HIF1 $\alpha$  による *EPO* mRNA の発現亢進によるものであると考えられた。このことは MDS における亜ヒ酸の血液学的効果の分子機序の一端を説明する可能性がある。

#### E. 結論

MDS の画期的分子標的療法の開発を目的として、ゲノム異常・蛋白異常の網羅的探索と特異的遺伝子の変異の解析を行い、MDS の病因・病態に関与する候補分子の同定に成功した。特に、ゲノム研究技術の進歩は著しく、詳細かつ精度の高いゲノムコピー数の変化と SNP の情報を同時に得ることが可能となった。これはピンポイントで候補遺伝子にせまれることを意味しており、今後次々と原因遺伝子が明らかにされていくことが期待される。さらに、同定された候補遺伝子・蛋白の機能解析も進んでおり、MDS の分子病態が DNA 修復異常・ROS 蓄積による酸化/還元状態の変

化という新しい観点から再検討される可能性が出て来た。治療開発研究では、免疫抑制療法シクロスポリンの作用機序および効果判定に関する新しい知見が得られた。一方、新規治療薬亜ヒ酸の造血機能への効果の検討が分子レベルで進められ、導入の基礎が固められた。最後に班研究の基盤整備を目的として、全国レベルの MDS 検体集積事業の準備を進めた。すでに研究計画書はほぼ完成しており、関係施設の倫理委員会に申請予定である。これは欧米諸国と並ぶエビデンス・レベルの高い分子病態研究を展開するために必須のシステムである。また、班活動を研究者に広く公開すること、患者の疾患・治療法に対する理解を支援する目的でホームページを開設した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. Takahashi W, Sasaki K, Komatsu N, Mitani K. *TEL/ETV6* accelerates erythroid differentiation and inhibits megakaryocytic maturation in a human leukemia cell line UT-7/GM. *Cancer Sci* 96: 340-348, 2005
2. Nakamura F, Nakamura Y, Maki K, Sato Y, Mitani K. Cloning and characterization of a novel chimeric gene *TEL/PTPRR* in acute myelogenous leukemia with inv(12)(p13q13). *Cancer Res* 65: 6612-6621, 2005
3. Maki K, Yamagata T, Asai T, Yamazaki I, Oda H, Hirai H, Mitani K. Dysplastic definitive hematopoiesis in *AML1/Evi-1* knock-in embryos. *Blood* 106: 2147-2155, 2005
4. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Ueda R, Kinoshita T, Emi N, Naoe T. Clinical characteristics and prognostic implications of *NPM1* mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 106: 2854-2861, 2005
5. Takeshita A, Shinjo K, Naito K, Matsui H, Sahara N, Shigeno K, Horii T, Shirai N, Maekawa M, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. Efficacy of gemtuzumab ozogamicin on ATRA- and arsenic-resistant acute promyelocytic leukemia (APL) cells. *Leukemia* 19: 1306-1311, 2005
6. Iwai M, Kiyoi H, Ozeki K, Kinoshita T, Emi N, Ohno R, Naoe T. Expression and methylation status of the *FHIT* gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 19: 1367-1375, 2005
7. Mitsuma A, Asano H, Kinoshita T, Murate T, Saito H, Stamatoyannopoulos G, Naoe T. Transcriptional regulation of *FKLF-2* (*KLF13*) gene in erythroid cells. *Biochim Biophys Acta* 1727: 125-133, 2005
8. Kajiguchi T, Yamamoto K, Sawa M, Emi N, Naoe T. Increased erythropoietin level and

reticulocyte count during arsenic trioxide therapy. *Leukemia* 19: 674-676, 2005

9. Ohyashiki K, Shay JW, Ohyashiki JH. Lack of mutations of the human telomerase RAN gene (hTERC) in myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 90: 691, 2005

10. Ohyashiki K, Aota Y, Akahane D. The JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in myelodysplastic syndromes (MDS) developing myelofibrosis indicates the myeloproliferative nature in a subset of MDS patients. *Leukemia* 19: 2359-2360, 2005

11. Ohyashiki JH, Hisatomi H, Ohyashiki K. Quantitative relationship between functionally active telomerase and major telomerase components (hTERT and hTR) in acute leukaemia cells. *Br J Cancer* 92: 1942-1947, 2005

12. Kazama H, Teramura M, Yoshinaga K, Kato T, Motoji T, Mizoguchi H. Proteomics approach to identifying proteins abnormally expressed in neutrophils in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia Res* 29 (Suppl 1): S46, 2005

13. Inukai T, Inaba T, Dang J, Kuribara R, Ozawa K, Miyajima A, Wu W, Look AT, Arinobu Y, Iwasaki H, Akashi K, Kagami K, Goi K, Sugita K, Nakazawa S. TEF, an anti-apoptotic bZIP transcription factor related to the oncogenic E2A-HLF chimera, inhibits cell growth by down-regulating expression of the common  $\beta$  chain of cytokine receptors. *Blood* 105: 4437-4444, 2005

14. Matsui H, Shinjyo T, Inaba T. Structure of the human Bim gene and its transcriptional regulation in Baf-3, interleukin-3-dependent hematopoietic cells. *Mol Biol Rep* 32: 79-85, 2005

15. Yamasaki M, Mishima KH, Yamashita H, Kashiwagi K, Murata K, Minamoto A, Inaba T. Neuroprotective effects of erythropoietin on glutamate and nitric oxide toxicity in primary cultured retinal ganglion cells. *Brain Res* 1050: 15-26, 2005

16. Hosoya N, Sanada S, Nannya Y, Nakazaki K, Wang L, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Ogawa S. Genome-wide screening of DNA copy number changes in chronic myelogenous leukemia with the use of high-resolution array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes and Cancer* (in press)

17. Nannya Y, Sanada M, Nakazaki K, Hosoya N, Wang L, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Bailey DK, Kennedy GC, Ogawa S. A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res* 65: 6071-6079, 2005

18. Hosoya N, Qiao Y, Hangaishi A, Wang L, Nannya Y, Sanada M, Kurokawa M, Chiba S, Hirai H, Ogawa S. Identification of a SRC-like tyrosine kinase gene, FRK, fused with ETV6 in a patient with acute myelogenous leukemia carrying a t(6;12)(q21;p13) translocation. *Genes Chromosomes and Cancer* 42: 269-279, 2005

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特許申請：60/734,278

「遺伝子変異検出用アレイおよび検出法」

出願日：2005年11月8日

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



## II. 分担研究報告

## 骨髄異形成症候群の白血化における TEL-p53 経路の関与

主任研究者 三谷絹子 獨協医科大学 内科学（血液） 教授

### 研究要旨

TEL 遺伝子はヒト染色体 12p13 上に存在し、白血病においては高頻度に再構成が観察される。TEL 蛋白は転写制御因子としての機能が報告されているが、造血細胞における作用は不明な点が多い。我々は患者検体における TEL の mRNA の alternative splicing について検討するとともに、骨髄球系細胞 32D に野生型 TEL 遺伝子を導入しその分子生物学的・細胞生物学的機能を解析した。骨髄異形成症候群から白血化した症例においては TEL のドミナント・ネガティブアイソフォームが高頻度に発現していた。また、32D 細胞においては野生型 TEL は IL-3 存在下では増殖抑制に作用し、G-CSF 存在下ではアポトーシスを誘導した。この作用の一部は TEL が p53 の蛋白レベルを上昇させることによるものであることが明らかになった。TEL-p53 経路の失活は骨髄異形成症候群からの白血化に関与している可能性があると考えられた。

### A. 研究目的

転写因子遺伝子 TEL はヒト白血病細胞において頻繁に再構成が観察され、その機能異常は白血病発症に深くかかわっていると考えられている。一方、TEL mRNA には多数の alternative splicing が存在し、その中の一部は野生型 TEL に対してドミナント・ネガティブに働くことが報告されている。本研究は骨髄異形成症候群（MDS）および MDS の白血病移行例において TEL mRNA のスプライシングがどのように変化しているのかを解析するとともに、野生型 TEL の分子生物学的・細胞生物学的機能を明らかにすることを目的とする。

### B. 研究方法

(1) 患者検体における TEL mRNA の解析：正常人（14 例）、MDS 患者（10 例）、MDS/白血病患者（7 例）の骨髄細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて TEL の各領域を増幅し、TEL mRNA の欠失あるいはスプライシングの変化などを調べた。(2) 野生型 TEL の分子生物学的・細胞生物学的機能解析：マウス骨髄細胞 32D に野生型 TEL を強制発現させ、IL-3 存在下での増殖能や G-CSF 存在下での分化能に変化が生じるかどうかを解析した。また、その分子基盤についても検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は当院の倫理委員会で承認されている。検討に用いた検体は、当該患者からインフォームドコンセントを得たのちに供与を受けた。

### C. 研究結果

(1) ヒト骨髄細胞においては野生型とエクソン 6+7 欠損型の TEL mRNA が発現していた。エクソン 6+7 欠損型 mRNA の発現頻度は正常人および MDS 患者においてほぼ同程度であった（14 例中 7 例 vs. 10 例中 3 例）。一方、MDS から白血化した症例はすべて（7 例中 7 例）エクソン 6+7 欠損型 mRNA を発現していた。(2) IL-3 存在下での増殖能をモック細胞および TEL 発現細胞（TEL-32D 細胞）で比較したところ、TEL-32D 細胞はモック細胞に比べて増殖能が低下していた。また、G-CSF 存在下では TEL-32D 細胞は 48 時間以内に急速に死滅した。Sub-G1 分画および Annexin V 陽性分画が蓄積して来ることから、TEL-32D 細胞の急速な細胞死はアポトーシス誘導によるものであることが明らかになった。さらに、TEL-32D 細胞ではミトコンドリアの膜電位が消失していることから、このアポトーシスはミトコンドリア依存性経路を介して誘導されると考えられた。TEL-32D 細胞における細胞周期制御因子およびアポトーシス制御因子の発現変化を調べたところ、p53 の蛋白レベルが増加していた。さらに、p53 阻害剤 pifithrin- $\alpha$  存在下で G-CSF を投与したところ、TEL-32D 細胞のアポトーシス誘導の開始が遅延した。

### D. 考察

MDS から白血化した症例では全例でエクソン 6+7 を欠損したドミナント・ネガティブ型の mRNA が発現していることから、野生型 TEL の機能的失活が MDS の病期進展に関与している可能性が示唆された。一方、培養細胞を用いた検討の結果、野生

型 TEL は骨髄球系細胞のアポトーシス誘導に対して促進的に作用することが明らかになった。さらに、この機能には p53 の発現亢進が関与している可能性が示唆された。TEL のアイソフォームの発現変化は、p53 の機能抑制を介して MDS を白血病へ進展させると考えられた。

#### E. 結論

病期の進展した MDS 症例では、p53 遺伝子の欠失及び変異が高頻度に観察されることから、p53 の機能的失活は白血病化に中心的役割を担うと考えられている。TEL のドミナント・ネガティブアイソフォームの発現亢進も、p53 の機能的失活を介して MDS を白血化させる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

1. Takahashi W, Sasaki K, Komatsu N, Mitani K. TEL/ETV6 accelerates erythroid differentiation and inhibits megakaryocytic maturation in a human leukemia cell line UT-7/GM. *Cancer Sci* 96: 340-348,2005

2. Nakamura F, Nakamura Y, Maki K, Sato Y, Mitani K. Cloning and characterization of a novel chimeric gene *TEL/PTPRR* in acute myelogenous leu-kemia with inv(12)(p13q13). *Cancer Res* 65: 6612-6621,2005

3. Maki K, Yamagata T, Asai T, Yamazaki I, Oda H, Hirai H, Mitani K. Dysplastic definitive hematopoiesis in *AML1/Evi-1* knock-in embryos. *Blood* 106: 2147-2155, 2005

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他  
いずれも予定なし

## 骨髓異形成症候群における免疫抑制剤の作用機序に関する研究

分担研究者 内山卓 京都大学医学研究科 血液・腫瘍内科学 教授

### 研究要旨

低リスク骨髓異形成症候群（MDS）に対するシクロスポリン療法の臨床試験の附随研究として行った T 細胞受容体レパトア解析ならびに spectratyping 法によるクロナリティー解析において、T 細胞の微小クローン性増殖を全例に認め、MDS における血球減少に微小クローン性 T 細胞が関与している可能性が示された。

### A. 研究目的

低リスク骨髓異形成症候群（MDS）に対するシクロスポリン療法の臨床試験において、血球改善効果が約 50%の患者に認められたことは、本邦の多くの MDS 患者の病態の成立に、免疫学的機序が関与していることを示している。シクロスポリンは T 細胞機能を全般的に抑制するため、日和見感染症などの有害事象の危険が伴う。一方、造血抑制性 T 細胞をクローンとして単離し、それらの認識する抗原を同定することができれば、より特異的な免疫抑制療法の開発が可能となるであろう。

### B. 研究方法

シクロスポリンの治療研究の前後で採取された末梢血液検体より分離した単核球より RNA を抽出し、microplate hybridization assay 法による T 細胞受容体（TCR）レパトア解析ならびに spectratyping 法によるクロナリティー解析を行い、T 細胞の微小クローン性増殖の存在とシクロスポリンの臨床効果との対比を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は遺伝子解析研究を含むため、検体採取にあたっては参加各施設の施設内審査機関による審査と当該患者の口頭と文書によるインフォームドコンセントを前提とした。採取検体は各施設で連結可能匿名化を行い検討に用いた。

### C. 研究結果

TCR レパトア解析ならびに spectratyping 法によるクロナリティー解析は 19 例で可能であり、全例で程度の差はあれ T 細胞の微小クローン性増殖が見られた。代表的な 12 種類の V $\beta$ における微小クローンの頻度をもとに、T 細胞のレパトアの多様性を 3 段階に分け、シクロスポリンの臨床効果と比較したところ、微小クローンの頻度の少

ない 6 例中 6 例、中等度であった 6 例中 1 例、高度であった 7 例中 3 例にシクロスポリンの効果を認め、微小 T 細胞クローンの頻度の低い例でシクロスポリンの反応性が高いことが示唆された。微小 T 細胞クローンの頻度の増加は、MDS を発症した結果、反復する感染症などによりもたらされる可能性も考えられたが、診断から治療までの期間もしくは好中球減少の程度と微小 T 細胞クローンの頻度に相関はみられなかった。

### D. 考察

MDS 患者においては、程度の差は見られるものの T 細胞の微小クローン性増殖が認められ、それらのあるものは MDS の免疫病態の成立に何らかのかたちで関与していることが示唆された。MDS の血球減少に対してシクロスポリンが有効である機序として、シクロスポリンが造血障害をもたらす  $\gamma$ -interferon 産生性 memory CD4+T 細胞の作用を抑制することが考えられている。HLA class II を共有する複数のシクロスポリン反応性 MDS 患者において、共通の TCR を持つ  $\gamma$ -interferon 産生性 CD4+T 細胞を検出できれば、その T 細胞は造血抑制に直接関与している可能性が高まる。今後、患者末梢血より分離した CD4 陽性 T 細胞を抗 CD3 抗体と抗 CD134 抗体で刺激することで memory T 細胞の選択的増殖を計り、その後 T 細胞受容体  $\beta$  鎖ごとの  $\gamma$ -interferon 産生能の検討と、spectratyping 法、さらには CDR3 領域の塩基配列の決定によるクローン性の確認を通じてこのような T 細胞が見い出されるか検討する予定である。

### E. 結論

MDS 患者においては T 細胞の微小クローン性増殖が認められ、それが MDS における血球減少に関与している可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
  2. 実用新案登録
  3. その他
- いずれも予定なし

## 骨髄異形成症候群に対する画期的治療法に関する研究

分担研究者 直江知樹 名古屋大学大学院医学系研究科血液腫瘍内科学 教授

### 研究要旨

MDS における分子異常の標的遺伝子群を明らかにするとともに、新規薬剤の開発を目的として研究を行っている。本年度は、(1) 急性骨髄性白血病で高率に変異を認めるヌクレオフォスミン NPM に着目し、NPM1 遺伝子の変異・発現・局在に関する研究を開始した。(2) 難治性急性前骨髄球性白血病の治療薬として注目されている亜ヒ酸療法が、一部の MDS に有効であるとの報告があり、その機序解明のため、ヒト正常造血に対する亜ヒ酸の影響を解析した。

### A. 研究目的

骨髄異形成症候群(MDS)は、造血におけるクローン性増殖と無効造血という二面性を有する疾患群であり、その背景には多様な分子病態の存在が示唆されている。我々は、骨髄分化に関与する転写因子群や転写制御因子群が、MDS の発症・進展に関与する可能性について研究を進めてきた。本年度は、急性骨髄性白血病の 1/4 において変異の見出されている NPM 遺伝子の変異・発現について解析を進めた。

また、欧米から MDS に対する有効例の報告がある亜ヒ酸治療について、その正常造血に対する影響およびそのメカニズムは知られていない。そこで、急性前骨髄球性白血病の地固め療法として亜ヒ酸療法が施行された症例における血球変動について解析を進めた。

### B. 研究方法

### C. 研究結果

(1) NPM に関しては、成人急性骨髄性白血病の 1/4 の症例において、C 末におけるフレームシフト変異が見出され、いずれの場合も 4bp の挿入により、フレームシフトが生じていた。変異は M3 を除くすべての病型に見出されること、正常核型に多いこと、FLT3 遺伝子変異と強く相関することなどを明らかにした。MDS 症例においては、42 例中 4 例に同様の 4bp 挿入変異が見出されたが、2 例は MDS からの Overt AML、2 例は染色体正常核形型 RAEB-t であった。CMMoL や RAEB、RA には変異を認めなかった。RA の 11 例中 3 例においては NPM1 の mRNA 発現が低下していた。

(2) 名大病院で亜ヒ酸による地固め療法（亜ヒ酸 0.15 mg/kg 毎日 28 日間）を受けた急性前骨髄球性白血病寛解期 7 例、のべ 17 コースにおける末梢血液所見を経時的に観察した。白血球数は治療により減少し、特に好中球数で著明であった。赤血

球数の変動は僅かで、網状赤血球数は概ね倍増した。血清中のエリスロポエチン (Epo) は増加した。亜ヒ酸の Epo に対する刺激効果を実証するため、hepatoma 細胞株 Hep3B 細胞に亜ヒ酸を添加し、Epo mRNA の用量依存的な増加と転写因子 HIF1  $\alpha$  の誘導を認めた。

（倫理面への配慮）

検討に用いた検体は、全て、診療上必要な臨床検査のために採取した残余で、当該患者のインフォームドコンセントを得た後に連結可能匿名化を施して検討に用いた。亜ヒ酸治療研究は倫理審査ならびに IRB で承認を受けて行ったものである。

### D. 考察

MDS における NPM1 変異が MDS のどのような病態・臨床像に関与するのか、症例数が少なく、また経過がフォローできた症例がないため、不明である。NPM1 ノックアウトマウスのハプロ不全が MDS を発症していることを考え合わせ、今後タンパクレベルでの解析を進める必要がある。また、MDS において NPM 変異ならびに発現低下が認められたことは、MDS の発症にも NPM が深く関わることのみならず、MDS からの AML と de novo AML の境界が不明瞭であることも示唆している。

亜ヒ酸の腫瘍アポトーシス誘導機構について我々の検討では、持続する JNK 活性化が関与することを報告してきたが、今回の EPO 誘導機構については、レドックスを介した HIF1  $\alpha$  タンパクの分解・安定化機構が、砒素による影響を受けたのであろうと推測された。欧米で一部の MDS 症例に赤血球回復が認められたとの報告があるが、この成果はそのメカニズムの一端を説明するかもしれない。

### E. 結論

(1) ヌクレオフォスミン NPM は、MDS からの急性白血病や RAEB-t でも変異し

ており、また RA では発現低下が認められた。(2) 亜ヒ酸は、EPO ならびに網状赤血球を増加させたが、これはおそらく HIF1 $\alpha$  の活性化を介したメカニズムによるものと考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Ueda R, Kinoshita T, Emi N, Naoe T. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 106: 2854-2861, 2005
2. Takeshita A, Shinjo K, Naito K, Matsui H, Sahara N, Shigeno K, Horii T, Shirai N, Maekawa M, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. Efficacy of gemtuzumab ozogamicin on ATRA- and arsenic-resistant acute promyelocytic leukemia (APL) cells. *Leukemia* 19: 1306-1311, 2005

3. Iwai M, Kiyoi H, Ozeki K, Kinoshita T, Emi N, Ohno R, Naoe T. Expression and methylation status of the FHIT gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 19: 1367-1375, 2005

4. Mitsuma A, Asano H, Kinoshita T, Murate T, Saito H, Stamatoyannopoulos G, Naoe T. Transcriptional regulation of FKLf-2 (KLF13) gene in erythroid cells. *Biochim Biophys Acta* 1727: 125-133, 2005

5. Kajiguchi T, Yamamoto K, Sawa M, Emi N, Naoe T. Increased erythropoietin level and reticulocyte count during arsenic trioxide therapy. *Leukemia* 19: 674-676, 2005

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特許申請：60/734,278

「遺伝子変異検出用アレイおよび検出法」

出願日：2005年11月8日

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## テロメア制御異常の解析

分担研究者 大屋敷一馬 東京医科大学 血液内科 教授

### 研究要旨

テロメラーゼの鋳型 RNA 部分である hTERC 突然変異の検出を試みた。対象は 42 検体の MDS (19 例の RA、14 例の RAEB、2 例の RAEB t ; 7 例では急性白血球移行でも検討) で、hTERC の 7 箇所 (C98T、G58A、C72T、 $\Delta$ 110-113、G305A、G322A、G450A) につき突然変異を PCR 法および direct sequencing 法により解析したが、突然変異は検出されなかった。本邦の成人例の骨髄不全、特に MDS においては、hTERC 突然変異の関与は少ない可能性が示唆された。これらの患者ではテロメアの短縮、テロメラーゼ再活性化がみられないことより、テロメラーゼそのものの異常、あるいはテロメラーゼ結合蛋白の異常が示唆された。

### A. 研究目的

骨髄異形成症候群 (MDS) では病型進展に伴いテロメアの短縮がみられる。しかしながら、一般的に MDS においてはテロメラーゼ活性が他の腫瘍に比べて低い。MDS を含む骨髄不全症候群ではテロメア動態を考える中で、テロメラーゼ活性の作用不全が重要な意義を持つ可能性が考えられるが、必ずしも生物学的意義は明確にされていない。そこで MDS におけるテロメラーゼ活性と直接的に関係すると考えられている TERC (テロメア鋳型 RNA 部分) 変異につき検討した。

### B. 研究方法

MDS 患者 35 例、42 検体 (RA 19 例、RAEB 14 例、RAEBt 2 例 ; 7 例では急性白血球移行期でも検討) の骨髄細胞より DNA を抽出。hTERC (NT005612.14) の 7 箇所 (C98T、G58A(template region)、C72T (pseudoknot domain)、 $\Delta$ 110-113、G305A (CR4-CR5 domain)、G322A、G450A (BOX H/ACA domain)) につき突然変異を検討した。hTERC 変異は PCR 法および direct sequencing 法により解析した。対象としては 4 歳から 90 歳までの健常人 134 例の末梢血単核球細胞を用いて検討した。さらに hTERC の 514 番目の polymorphism について検討した。また、MDS 患者では既報に則りテロメア長およびテロメラーゼ活性を測定した。

### C. 研究結果

42 MDS 検体でのテロメア短縮例は 27%、テロメア正常例は 69%、テロメア延長例は 5% であり、テロメラーゼ活性は全例で正常造血細胞と同様に低下例であった。MDS 検体および 134 健常人検体では hTERC の突然変異は検出されなかった。また、514 番目の polymorphism では、AA 型 (MDS 11.1%、健常人 11.9%)、AG 型

(MDS 55.6%、健常人 51.4%)、GG 型 (MDS 33.3%、健常人 36.7%) と MDS と健常人での偏りは観察されなかった。

### D. 考察

hTERC の特定の突然変異はテロメラーゼ活性に影響を及ぼすことが知られている。多くの MDS 患者ではテロメア短縮があるにもかかわらず、テロメラーゼ再活性化がみられない。このことは MDS 細胞においてはテロメラーゼ再活性化機構に障害がある可能性を示唆している。既報では 55 例の MDS 患者で黒人の 2 人に G58A 変異および G322A 変異の報告がある。G58A 変異は黒人健常人の 5/24 例でも観察されることよりテロメラーゼ活性に影響を及ぼす変異とは考えがたい。一部の骨髄不全症候群の患者においては hTERC 変異によるテロメラーゼ活性の低下がテロメア動態に影響を及ぼす可能性は否定しきれない。しかしながら、成人で家族歴をもたない MDS 患者においては hTERC 変異よりもテロメア結合蛋白の異常によるテロメア長監視機構の障害による病態の可能性が示唆される。

### E. 結論

成人 MDS におけるテロメア動態に hTERC 変異が関与する可能性は低いと思われる。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

論文発表

1. Ohvashiki K, et al. Lack of mutations of the human telomerase RAN gene (hTERC) in myelodysplastic syndrome. Haematologica 90: 691, 2005
2. Ohvashiki K, et al. The JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in



myelodysplastic syndromes (MDS) developing myelofibrosis indicates the myeloproliferative nature in a subset of MDS patients. *Leukemia* 19:2359-2360,2005

3. Ohyashiki JH, Ohyashiki K, et al. Quantitative relationship between functionally active telomerase and major telomerase components (hTERT and hTR) in acute leukaemia cells. *Br J Cancer* 92: 1942-1947,2005

#### 学会発表

1. Ohyashiki K, et al. Additional cytogenetic changes and prior genotoxic exposure predict unfavorable prognosis in MDS and AML with del(1;7)(q10;p10). American Society of Hematology (2005/December)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他  
いずれも予定なし

## 骨髄異形成症候群に対する画期的治療法に関する研究

分担研究者 稲葉俊哉 広島大学原爆放射線医科学研究所 教授

### 研究要旨

7番染色体長腕(7q)領域には、古くより MDS の発症を抑制する遺伝子の存在が想定されてきた。この遺伝子を同定するため、われわれは微小染色体欠失を高感度に検出できる「長鎖 PCR 支援マイクロアレイ CGH 法」を独自に開発してきたが、このシステムを用いて、7q 領域内にある共通微小欠失領域の同定に成功した。この領域には三つの遺伝子が座位した。三遺伝子とも進化上、脊椎動物にのみ存在し、機能上および遺伝子の進化上互いに密接に関連していたが、既知遺伝子との相同性や既知の機能モチーフを有しておらず、過去に研究の対象となつてこなかった遺伝子群であった。われわれはこれらの遺伝子産物の生化学的機能の検討を進めた結果、ひとつの遺伝子産物は分裂期の紡錘糸に結合し、M 期チェックポイントに関連する可能性が示唆された。あとの二遺伝子産物は Ku70/Ku80/DNA-PKcs 複合体との結合が示され、DNA 二重鎖切断時の非相同組換え断端結合(NHEJ)による修復に関与している可能性が示された。

### A. 研究目的

MDS は AML とは異なり、染色体転座に伴うキメラ遺伝子の発現はまれで、染色体欠失による発がん遺伝子の欠損や点突然変異の蓄積によって生じると考えられている。近年、点変異についてはわれわれが検討を進めてきた AML1 転写因子の点変異 (RAEB など予後不良の「前白血病タイプ」の MDS の約 20% に認められる) や SHP2 の異常など、その一端がつかめてきた。その一部はイマチニブなど既存の分子標的薬が有効である可能性があり、その意味でも大変重要である。これに対して染色体 (部分) 欠失に伴う MDS 発症抑制遺伝子の欠損は、責任遺伝子の同定がほとんどなされていない。前白血病タイプの MDS の大多数が何らかの染色体欠失を有していると考えられることから、MDS の画期的治療法開発のためには、染色体欠失部位からの責任遺伝子の同定が急務である。

そこでわれわれは 2001 年より、微小染色体欠損を極めて高感度に同定できるシステムである「長鎖 PCR 支援マイクロアレイ CGH システム」の開発を急いだ。本システムは 2004 年におおむね完成し、数 10kb 程度の微小欠損を捕らえるなど、従来のマイクロアレイ CGH 法に比較して格段に高感度の性能を得たので (特許出願準備中)、これを用いて MDS に見られる最も代表的な染色体欠損である 7q 欠失部位からの責任遺伝子の同定を試みた。その結果 30-40% の高頻度に共通の微小欠失領域を発見した。われわれはこの共通欠失領域内に存在する遺伝子を同定し、当該遺伝子産物の生化学的および生物学的機能を検討した。

### B. 研究方法

7q 欠失の共通欠失領域からデータベースの検索によって得られた責任遺伝子候補の cDNA をクローニングし、発現ベクターを作成した。大腸菌を用いて遺伝子産物を発現させ、ウサギを免疫してポリクローナル抗体を作成、抗原で精製した。結合蛋白質の精製・同定は、アフィニティ精製後 SDS-PAGE で分離、銀染色後目的バンドを切り出し、TOF/TOF 型の質量解析器で行った。

### C. 研究結果

MDS で見られる 7q 共通欠失領域には、データベース上三つの遺伝子が存在したので *Miki*、*Kasumi*、*Titan* と命名した。脊椎動物以外に相同性のある遺伝子は認められない。魚類と鳥類では *Miki* と *Titan* が融合した形の遺伝子がひとつ存在するが、哺乳類になってマウスまでに *Miki* と *Titan* は分離して別の遺伝子を形成する。さらにヒトまでに *Titan* が遺伝子重複を起こして *Kasumi* 遺伝子が出現した。すなわち本遺伝子群は、進化上脊椎動物になって出現し、哺乳類になってからも遺伝子の構造を大きく変えている新しい遺伝子である。いずれも既知遺伝子との相同性に乏しく既知モチーフを持たないため、アミノ酸配列からの機能の類推が不可能であった。このためわれわれは細胞内局在と結合相手蛋白質の同定を通じて、遺伝子産物機能の類推を試みた。結合蛋白質の同定では *Miki* と *Kasumi* はその N 末側の無構造領域 (ループ) で Ku70/Ku80/DNA-PKcs 複合体と結合することが明らかになった。本複合体は細胞に二本鎖 DNA 切断が生じた際、非相同組換え断端結合(NHEJ)による修復過程で重要な役割を果たす。このため *Titan*/*Kasumi* は、DNA 損傷修復に関与していると考えら

れた。この仮説を支持するデータとして両者とも通常主に細胞質内に局在するが、放射線照射やマイトマイシン C 処理により核内に移行する現象が認められた。一方、Miki は分裂間期には細胞質にび漫性に存在するが、分裂期には、まず中心体に共局在し、それより伸びる紡錘糸に局在することが明らかとなった。

#### D. 考察

われわれは MDS の画期的治療法開発のためには二つのアプローチがあると考え、研究を進めてきた。ひとつは点変異を同定し、その異変が異常を引き起こすシグナル伝達経路を解明して、分子標的薬の適応を決定すること、もうひとつは、共通欠失部位から MDS 発症抑制遺伝子を同定し、その機能解析から標的分子に至るアプローチである。今回われわれは、こうした染色体欠失の中でもっとも高頻度である 7q 欠損遺伝子候補の同定に成功した。不幸にして本候補遺伝子群は既知遺伝子との相同性が全くなく、既知機能モチーフもほとんどないことからその性状の解析に手間取っている。しかし研究室の総力を挙げた研究の結果、DNA 修復系との関連性が示唆されるに至った。

DNA 修復系の遺伝子は乳がんなどにおいては相同組換えによる修復システム(HR)に関与する BRCA 遺伝子群の欠損が知られてきたが、造血器腫瘍においてはあまり例がない。また NHEJ に関与する遺伝子は、遺伝子欠損モデルマウス系では白血病や悪性リンパ腫が多発するが、ヒト造血器腫瘍との関連は明らかではない。造血幹細胞の大多数が骨髄ニッチ内において G0 期で停止している。DNA 損傷は姉妹染色分体が存在しない G0/G1 期で起きると考えられることから、造血幹細胞の DNA 損傷修復には姉妹染色分体を必要としない NHEJ が主に機能すると推察される。従って、MDS が多くの遺伝子変異の蓄積で発症することを考えあわせると、本遺伝子群が有力な分子標的になる可能性は高いと考え、その機能の詳細な解析を急いでいる。

#### E. 結論

7q に存在する MDS 抑制遺伝子の有力候補を同定し、それらの遺伝子産物と DNA 修復系との関連を示唆する知見を得た。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

1. Inukai T, Inaba T, Dang J, Kuribara R, Ozawa K, Miyajima A, Wu W, Look AT, Arinobu Y, Iwasaki H, Akashi K, Kagami K, Goi K, Sugita K, Nakazawa S. TEF, an anti-apoptotic bZIP transcription factor related to the oncogenic E2A-HLF chimera, inhibits cell growth by downregulating expression of the common b chain of cytokine receptors. *Blood* 105: 4437-4444, 2005
2. Matsui H, Shinjyo T, Inaba T. Structure of the human Bim gene and its transcriptional regulation in Baf-3, interleukin-3-dependent hematopoietic cells. *Mol. Biol. Rep.* 32: 79-85, 2005
3. Yamasaki M, Mishima KH, Yamashita H, Kashiwagi K, Murata K, Minamoto A, Inaba T. Neuroprotective effects of erythropoietin on glutamate and nitric oxide toxicity in primary cultured retinal ganglion cells. *Brain Res* 1050: 15-26, 2005

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他  
いずれも予定なし

## プロテオミクスの手法を用いた MDS 関連蛋白の 同定とその解析

分担研究者 寺村正尚 東京女子医科大学血液内科 講師

### 研究要旨

骨髄異形成症候群(MDS)患者の血球のプロテオーム解析を行った。MDS 患者と正常人における末梢血中の好中球由来蛋白の二次元電気泳動を行い、両群の蛋白発現パターンを解析し、両群間で発現の異なるスポットについて質量分析を行った。その結果、MDS 特異的に発現異常を有する蛋白として CapG および Thiol-specific antioxidant protein が同定された。これらの蛋白は MDS の病態に深く関与していると考えられ、本症の診断および治療法の開発につながる可能性がある。

### A. 研究目的

近年、DNA チップなどの解析手法を用いて、疾患特異的な遺伝子の探索が大規模に行われている。しかし、遺伝子の発現と蛋白質の発現は必ずしも相関するものではないことも知られている。また、むしろ翻訳後の蛋白の修飾が病因や病態に大きく関わる場合も想定される。したがって、病因や病態を解析するためには、プロテオミクスの手法を用いた蛋白レベルでの網羅的解析も行う必要があると考えられる。本研究はプロテオミクスの手法を用いて骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome:MDS)における疾患特異的な蛋白質を明らかにし、その機能を解析するとともに、何らかの疾患マーカー、治療のターゲットとなる蛋白を同定することを目的とした。

### B. 研究方法

MDS の中で最も頻度が高いサブグループである不応性貧血 (refractory anemia: RA)患者の好中球を対象としてプロテオーム解析を行った。これを解析対象とした理由は以下の通りである。

(1)MDS(RA)の好中球は異常クローン由来であり、形態学的、細胞生化学的な異常が認められることから、何らかの蛋白異常が存在していると考えられる。

(2)臨床的に末梢血を検査するだけで、MDS を診断しうるような、実用的な疾患特異的マーカーを同定できる可能性がある。

(3)検体の採取が容易であるため、骨髄に比して検体の収集が進みやすい。

研究方法としては、MDS 患者および正常人の末梢血よりデキストラン法を用いて好中球を分離した。その細胞より蛋白を抽出した後、二次元電気泳動を行った。両者の泳動パターンについて解析ソフト

(Ettan progenesis)を用いて比較検討した。発現量に差が認められたスポットについて質量分析を行い(MALDI-TOF/TOF MS を使用)、その蛋白についてペプチドデータベース(MASCOT)を用いて同定した。また、同定した蛋白の好中球における遺伝子発現についてリアルタイム PCR 法を用いて検討し、さらに細胞内局在を免疫細胞染色により検討した。

(倫理面への配慮)

MDS 患者および正常人に対して本研究について説明した後、文書にて同意を得た上で血液の提供を受けた。

### C. 研究結果

MDS 患者と正常者における末梢血好中球由来の蛋白泳動パターンを解析ソフトで分析したところ、MDS において明らかに異常発現しているスポットが認められた。それらのスポットについて MS によるペプチドマップを作製し、データベース上でペプチドマス・フィンガープリント測定を行い、蛋白を数種同定した。そのうちの 2 つは CapG および Thiol-specific antioxidant protein (TSA)であった。MDS 好中球においてはリン酸化 CapG が低下していた。CapG の細胞内局在を検討したところ、正常人好中球のほとんどは細胞質優位に細胞質および核内に存在していたのに対し、MDS では核内優位に強く発現している好中球が高頻度に認められた。また、Thiol-specific antioxidant protein (TSA) の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法を用いて検討したところ、正常人好中球と比べ有意な発現量の差は認められなかった。

### D. 考察

MDS 患者の好中球に発現異常のある蛋白を同定した。その 1 つは CapG である。